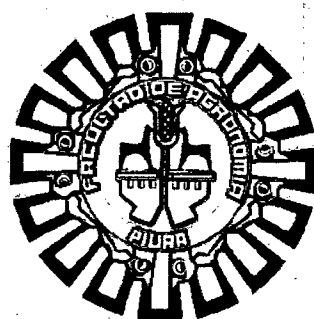


UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE
NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS A
LOS CULTIVOS DE BANANO, CAÑA DE AZÚCAR Y
ARROZ EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS
DEL NORTE DEL PERÚ”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTADO POR:

Br. MAYRA ALEJANDRA LOPEZ HIDALGO

**PIURA – PERÚ
2018**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMATODOS
DEL GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE
BANANO, CAÑA DE AZÚCAR Y ARROZ EN LAS PRINCIPALES
ZONAS PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERÚ”**

TESIS

**PRESENTADA A LA FACULTAD DE AGRONOMÍA PARA
OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

Dr. CÉSAR MURGUÍA REYES
ASESOR

ING. ISRAEL LIMA MEDINA Ph.D.
CO - ASESOR

Br. MAYRA ALEJANDRA LOPEZ HIDALGO
TESISTA

PIURA – PERÚ
2018

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE LA TESIS

Yo: Br. MAYRA ALEJANDRA LOPEZ HIDALGO, identificada con DNI N° 48536502, bachiller de la Escuela Profesional de Agronomía, de la Facultad de Agronomía y domiciliado en La Primavera III Etapa Mz. D2 Lt. 10 - Castilla, Provincia de Piura, Departamento de Piura. Celular: 985091287 Correo: lópez_unp@hotmail.com

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es auténtica e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada y/o realizada en el Perú o en el extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código penal concordante con el Art. 32 de la ley N° 27444, ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fé de lo cual firmo la presente.

Piura, Junio del 2018.

.....
DNI N° 48536502



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA



FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

**“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMATODOS
DEL GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE
BANANO, CAÑA DE AZÚCAR Y ARROZ EN LAS PRINCIPALES
ZONAS PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERÚ”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

Br. MAYRA ALEJANDRA LOPEZ HIDALGO

APROBADO POR:



ING. JAVIER JAVIER ALVA MSc.
PRESIDENTE



ING. CARLOS E. SAN MARTÍN ZAPATA
VOCAL

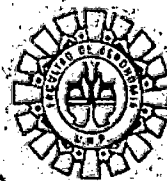


ING. EDGAR A. MALDONADO DUQUE
SECRETARIO

PIURA – PERÚ
2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISION DE INVESTIGACION AGRICOLA



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS
062-2017-CIAFA-UNP

Los miembros del jurado calificador que suscriben, congregados para estudiar el Trabajo de Tesis denominado **"CARACTERIZACION DE POBLACIONES DE NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE BANANO, CAÑA DE AZUCAR Y ARROZ EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERU"**, conducido por la **BR. MAYRA ALEJANDRA LOPEZ HIDALGO**, asesorada por el **Dr. Cesar Murguía Reyes y Co** - asesorada por el **Ing. Israel Lima Medina PH.D.**

Luego de oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, la declaran **APROBADA** en consecuencia queda en condiciones de ser calificada **APTA** para gestionar ante el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo de conformidad con lo estipulado en el artículo N° 171, inciso 2° del Estatuto General de la Universidad Nacional de Piura.

Piura, 11 de Diciembre del 2017.


Ing. Javier Alva MSc.
Presidente


Ing. Carlos E. San Martín Zapata
Vocal


Ing. Edgar A. Maldonado Duque
Secretario

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor y brindarme la dicha de tener a mis padres, quienes me apoyan en todo momento a lo largo de la carrera profesión.

A mi hermano Juan Carlos, por su apoyo emocional e intelectual, así como a todos aquellos que directa e indirectamente fueron partícipes de este proyecto.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue financiado por Innovate Perú (Ministerio de la Producción) mediante el Proyecto titulado: “Diversidad biológica de poblaciones peruanas de *Meloidogyne* spp.: Descripción y caracterización de especies a través del uso de isoenzimas y marcadores moleculares” correspondiente al Convenio N° 346-PNICP-BRI-2015.

Al Doctor Isarel Lima Medina, por el aporte científico e intelectual.

A mi asesor César Murguía, por la amistad y consejos brindados, así como a todos los docentes del departamento de Sanidad Vegetal de los cuales tuve el conocimiento de esta noble carrera.

A mis amigos Manuel y Cinthia por el apoyo brindado para la culminación de la tesis.

RESUMEN

Se conoce que los "nematodos de las agallas radiculares" *Meloidogyne* spp. ocasionan daños en la producción de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz en muchas zonas productoras del Perú, sin embargo, no existe información científica sobre su ocurrencia, distribución e identificación de especies de estos nematodos. En el presente estudio se realizaron muestreos nematológicos en diferentes regiones productoras de estos cultivos para obtener poblaciones e identificar las especies de *Meloidogyne* a través del análisis de isoenzimas, la caracterización morfológica del diseño perineal de hembras y cuantificar la densidad poblacional del nematodo. Se obtuvieron 6 poblaciones del nematodo procedentes de raíces y suelo de plantas de banano, caña de azúcar y arroz en diferentes zonas productoras de las regiones de Piura y San Martín. Se identificaron dos especies de *Meloidogyne* asociadas al cultivo de banano en la costa y selva norte del Perú. *M. incognita* con fenotipo I2 es la especie asociada a una zona productora de la región Piura y *M. javanica* con fenotipo J3 se detectó tanto en la costa como en la selva. En el cultivo de caña de azúcar sólo se identificó a *M. incognita*. En el cultivo de arroz se identificó el fenotipo VS1 correspondiente a *M. graminicola*. Las especies de *Meloidogyne* identificadas en banano, caña de azúcar y arroz son los primeros reportes para estos cultivos en la costa y selva norte del Perú.

Palabras claves: Nematodo del nudo, isozyme, *Musa*, *Saccharum*, *Oryza*.

ABSTRACT

It is known that the "nematodes of the root galls" *Meloidogyne* spp. cause damages in the production of banana, sugar cane and rice crops in many producing areas of Peru, however, there is no scientific information on their occurrence, distribution and identification of species of these nematodes. In the present study, nematological samplings were carried out in different regions producing these crops to obtain populations and identify the *Meloidogyne* species through isoenzyme analysis, the morphological characterization of the perineal design of females and quantify the population density of the nematode. Six populations of the nematode were obtained from roots and soil of banana plants, sugarcane and rice in different producing areas of the Piura and San Martin regions. Two *Meloidogyne* species associated with banana cultivation were identified on the coast and northern of Peru. *M. incognita* with phenotype I2 is the species associated to a producing area of the region Piura and *M. javanica* with phenotype J3 was detected both on the coast and in the country. In the sugarcane crop, only *M. incognita* was identified. In rice crop, the VS1 phenotype corresponding to *M. graminicola* was identified. The *Meloidogyne* species identified in banana, sugar cane and rice are the first reports for these crops on the coast and northern of Peru.

Key words: Root knot nematodes, isoenzymas, *Musa*, *Saccharum*, *Oryza*.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	2
1.2. Objetivos Específicos	2
CAPÍTULO 2	3
2. REVISIÓN DE BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Origen, morfología, clima y otras características agronómicas del cultivo de banano, caña de azúcar y arroz	3
2.1.1. Banano (<i>Musa</i> spp.)	3
2.1.2. Caña de azúcar (<i>Saccharum</i> spp.)	4
2.1.3. Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	4
2.2. Nematodos asociados al banano, caña de azúcar y arroz	5
2.2.1. <i>Meloidogyne</i> spp.	6
2.2.2. Ciclo de Vida	6
2.2.3. Formas de Reproducción	9
2.2.4. Factores del ambiente que afectan el desarrollo del nematodo	10
2.2.5. Distribución y hospedantes	11
2.2.6. Sintomatología	11
2.2.7. Identificación de especies de <i>Meloidogyne</i>	12
2.2.7.1. Uso de patrones perineales	12
2.2.7.2. Análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas	13
CAPÍTULO 3	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Lugar y período de ejecución	14
3.1.2. Fase de laboratorio	14
3.2. Muestreos	15

3.3. Procesamiento y extracción de nematodos de muestras de suelo	15
3.4. Procesamiento y extracción de huevos más J2 de <i>Meloidogyne</i> spp. de raíces	16
3.5. Aislamiento de poblaciones	16
3.5.1. Obtención de poblaciones en plantas de tomate	16
3.5.2. Purificación de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	16
3.6. Observación de diseños perineales hembras de <i>Meloidogyne</i> spp.	17
3.7. Caracterización bioquímica para especies de <i>Meloidogyne</i>	17
CAPÍTULO 4	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Obtención de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	19
4.2. Caracterización bioquímica	21
4.3. Caracterización morfológica	25
CAPÍTULO 5	26
5. CONCLUSIONES	26
CAPÍTULO 6	27
6. RECOMENDACIONES	27
CAPÍTULO 7	28
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1	
Ubicación geográfica de las zonas productoras muestreadas de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz.	14
Cuadro 2	
Niveles de infestación en suelo e inóculo en 6 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. procedentes de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz en diferentes zonas de las regiones de Piura y San Martín.	19
Cuadro 3	
Fenotipos isoenzimáticos de esterasa observados en 6 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. provenientes de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz colectados en diferentes zonas de la costa y selva norte del Perú.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Procedimiento para la obtención de poblaciones de <i>Meloidogyne</i>	17
Figura 2.	Localización y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz en diferentes sectores productores de la región Piura.	20
Figura 3.	Localización y distribución de especies de <i>M. javanica</i> en el cultivo de banano en el distrito de Rioja, región San Martín.	20
Figura 4.	Plantas de banano, caña de azúcar y arroz; presentando síntomas de amarillamiento en hojas, menor crecimiento y agallas en raíces causadas por <i>Meloidogyne</i> spp.	21
Figura 5.	Fenotipos de esterasa detectados en 6 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. provenientes de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz de diferentes regiones geográficas de la costa y selva norte del Perú.	24
Figura 6.	Fenotipos de esterasa (Est) detectados en seis poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. aisladas de los cultivos de caña de azúcar, banano y arroz procedentes de diferentes regiones productoras de las regiones de Piura y san Martín.	24
Figura 7.	Patrones perineales de tres especies de <i>Meloidogyne</i> . detectadas en diferentes regiones geográficas y cultivos en la costa y selva norte del Perú.	25

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El banano (*Musa* sp.) es un cultivo alimenticio, su exportación genera importantes ingresos económicos para los productores, en los últimos diez años el Perú se ha insertado en la comunidad de países exportadores de banano orgánico. Las principales áreas de producción se ubican en: Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad (Agrobanco 2013). Se estima que la superficie sembrada de plátano y banano es de alrededor de 145,700 ha. La caña de azúcar (*Saccharum* spp.), es un cultivo tradicional de importancia económica, social y ambiental para el país, se cultiva en cinco departamentos y el 82 % del área sembrada se encuentra en la costa norte del Perú. La Libertad, destaca como primer productor de caña de azúcar seguida de Lambayeque. La producción nacional es aproximadamente 650,000 a 750,000 T de azúcar /año. El cultivo de caña de azúcar para la obtención de etanol se desarrolla principalmente en Piura en un área sembrada que supera las 7000 ha que generan 35,000 litros de etanol/día (MINAG, 2015). Respecto al cultivo de arroz (*Oryza sativa*), se conoce que los valles de mayor producción de este cereal se ubican en la costa norte, la ceja de selva y selva del Perú. Las regiones de San Martín, Piura, La Libertad, Lambayeque, Amazonas y Arequipa concentran el 78.1% de la producción nacional (MINAG-DGCA-DIA, 2012).

Debido a la importancia social y económica de estos cultivos en el Perú, es importante realizar estudios de los patógenos que los afectan, especialmente de los nematodos parásitos de plantas. En el norte del Perú el “nematodo formador de agallas radicales” *Meloidogyne* spp. es un serio problema para el normal desarrollo especialmente de las plantaciones de banano y caña de azúcar, encontrándose muy diseminado en los suelos de textura arenosa. Las especies de *Meloidogyne* spp. afectan a las plantas al debilitar las puntas de las raíces, inhibiendo su desarrollo, debido a la formación de agallas, las cuales atroflan el sistema radicular, disminuyendo la absorción de agua y nutrientes (Siddiqui, 2000). *Meloidogyne* spp. tienen un amplio y numeroso rango de plantas hospedantes, muchas familias de plantas con especies susceptibles al nematodo, es común que una especie de *Meloidogyne* pueda

afectar un gran número de hospedantes y a su vez un mismo hospedante ser afectado por varias especies del nematodo, causándose un solapamiento.

Considerándose la importancia que representan para el país los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz y debido también al daño que ocasiona *Meloidogyne* spp. en la producción de estos cultivos es necesario realizar estudios más profundos para determinar la ocurrencia, distribución e identificación de especies de “nematodos de las agallas radiculares”.

1.1. OBJETIVO GENERAL

- a. Caracterización de poblaciones de *Meloidogyne* asociadas a los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz en zonas productoras de las regiones de Piura y San Martín.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Cuantificación de la densidad poblacional de *Meloidogyne* spp. asociadas a los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz en las principales zonas productoras del norte del Perú.
- b. Identificación de especies de *Meloidogyne* procedentes de poblaciones aisladas de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz a través del análisis de isoenzimas.
- c. Caracterización morfológica del diseño perineal de hembras de *Meloidogyne* spp. de poblaciones aisladas de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz.

CAPÍTULO 2

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origen, morfología, clima y otras características agronómicas del cultivo de banano, caña de azúcar y arroz

2.1.1. Banano (*Musa* spp.)

El centro de origen del banano se encuentra ubicado en el sureste asiático e Indochina, región donde ocurrió su domesticación para ser cultivado. El banano es una planta monocotiledónea herbácea, clasificada dentro de la familia *Musáceas*, género *Musa* y orden Zingiberales. El nombre de banano es originario de África y se aplica principalmente a los cultivares cuya fruta es de consumo fresco como el Gros Michel y el Cavendish, la mayoría de los bananos comestibles pertenecen a dos especies silvestres: *Musa acuminata* y *M. balbisiana*, las cuales en su forma silvestre son diploides y fértiles, mientras los genotipos cultivados son partenocarpios y estériles, condiciones indispensables para obtener fruta comestible (Stover y Simmonds, 1987). Las raíces del banano poseen forma de cordón y aparecen en grupos de 3 ó 4. Poseen raíces superficiales y se distribuye en una capa de 30 a 40 cm. El cormo se define como un tallo que desarrolla hojas en la parte superior y raíces adventicias en la parte inferior o rizomorfo. Los nudos están muy agrupados y en cada uno de ellos hay una hoja cuya base foliar se extiende lateralmente hasta circundarlo. Tanto las hojas bien desarrolladas como las escuamiformes de lámina foliar reducida que las anteceden, subtienden una sola yema lateral o futuro retoño (Champion, 1968). La producción de las hojas cesa cuando emerge la inflorescencia. El pseudotallo ofrece a la planta apoyo y la capacidad de almacenar reservas amiláceas; por otra parte, le permite alcanzar mayor altura y elevar el nivel de las láminas foliares que captan la luz solar. En una planta adulta puede medir 5 m de altura y 40 cm de diámetro según el clon (Simmonds, 1973). Cuando se han producido cerca de 20 hojas, surge el tallo floral, cuya continuación forma el eje de la inflorescencia. La inflorescencia está formada por glomérulos florales dispuestas en dos hileras e insertadas en el raquis, conocidos como coronas (manos). El fruto se forma partiendo de los ovarios de las flores pistiladas que muestran un gran aumento en volumen; la parte comestible es el

resultado del engrosamiento de las paredes del ovario convertido en una masa parenquimatosa cargada de azúcar y almidón. Puede cultivarse desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm, con temperatura promedio para clima medio entre 22°C y de 29°C. Los suelos más aptos para su siembra y explotación son los de reacción neutra (pH 6.5 – 7), aunque también tolera los ligeramente ácidos y alcalinos, considerándose por lo tanto apropiado para su siembra, todos aquellos suelos que presentan un pH comprendido entre 5.5 y 7.2. Los suelos deben ser sueltos, ricos en materia orgánica, fértiles y con buen drenaje.

2.1.2. Caña de azúcar (*Saccharum* spp.)

Probablemente la caña de azúcar sea originaria de Nueva Guinea. Es un cultivo pluriannual, se corta cada doce meses y la plantación dura aproximadamente 5 años, tiene un tallo macizo de 2 a 5 m de altura y 3 a 5 cm de diámetro, siendo el órgano más importante ya que almacena azúcares. Los tallos de la caña de azúcar están formados por anillos de crecimiento denominados nudos donde se desarrollan las yemas y las hojas. El sistema radicular está formado por dos tipos de raíces: las raíces primordiales o de la estaca original y las raíces del brote nuevos de rápido crecimiento, la inflorescencia consiste en una panícula sedosa en forma de espiga compuesta por un eje principal con articulaciones insertadas de espiguillas una frente a otra, las cuales tienen una flor hermafrodita con tres anteras y un ovario con tres estigmas. El trópico húmedo es el mejor clima para la caña de azúcar, las condiciones climáticas son más importantes que las condiciones de suelo. El verano largo y caliente, seco y soleado y frío en la época de maduración y cosecha son las mejores condiciones para este cultivo. Puede cultivarse desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a los 1500msnm. Se obtienen mayores rendimientos con una temperatura máxima de 30°C y mínima de 18°C.

2.1.3. Arroz (*Oryza sativa*)

El arroz es una de las plantas cultivadas más antiguas cuyo origen se considera en el sur este asiático, principalmente de la India en donde se distribuyó a todos los países del mundo. Es una planta de alta variabilidad genética, representada por muchas especies y miles de cultivares que han resultado de procesos naturales de evolución y de cruces artificiales realizadas por el hombre. Es una planta

anual, adaptada para desarrollar bajo condiciones semi-acuáticas y acuáticas, con un sistema radicular bastante ramificado y superficial. Los tallos son cilíndricos y huecos formados por una serie de nudos y entrenudos que varían en número y tamaño según los cultivares. Las hojas son largas, más o menos angostas, compuestas por vaina, limbo y cuello, donde se insertan la lígula y las aurículas. La panoja es una inflorescencia constituida por flores hermafroditas, unifloras, compuestas por seis estambres y un ovario bifido y plumoso que envuelve a un solo ovulo. El fruto es una cariósipide envuelto por las glumas (lemma y palea) y la semilla propiamente dicha está constituida por el endospermo y el embrión. Los factores climáticos que más influyen en su producción son la temperatura, radiación solar y el agua, puesto que afectan directamente los procesos fisiológicos incluyendo la producción en grano e indirectamente por la presencia de plagas y enfermedades. Los requerimientos térmicos del arroz, varían de acuerdo a la etapa de desarrollo de la planta; sin embargo, la temperatura mínima para el cultivo oscila entre 20°C, con una media de 28 – 32°C, y una máxima de 35°C. Los suelos requeridos por el cultivo de arroz, deben ser los más planos posibles y en especial suelos pesados, arcillosos, retentivos, con buen drenaje y un pH entre 6.5 y 8.5 (De Datta, 1987).

2.2. Nemátodos asociados al banano, caña de azúcar y arroz

Los nematodos parásitos son las plagas más dañinas de las musáceas. Alrededor de 100 especies fitonematodos se han reportado sobre estos cultivos. Las pérdidas por los nematodos en muchas regiones productoras de banano son muy altas, con un promedio anual de pérdidas de rendimiento de más o menos del 20 % a nivel mundial. Como la mayoría de los cultivos tropicales, los bananos, son caracterizados por el parasitismo de nematodos poliespecíficos. El “nematodo barrenador” *Radopholus similis* es de amplia distribución y la especie más dañina de este cultivo. Aunque otros géneros de nematodos pueden estar presentes en un mismo sistema radicular, tales como los nematodos de la lesión (*Pratylenchus* spp.), espiral (*Helicotylenchus* spp.) y el formador de agallas radiculares (*Meloidogyne* spp.) (Gowen, 1979; Gowen y Queneherve, 1990).

Se ha indicado que la comunidad de nematodos que afectan la producción de caña de azúcar está compuesta de numerosas especies de endoparásitos y ectoparásitos y muchos géneros de nematodos pueden ser patogénicos a la caña de azúcar, siendo *Meloidogyne* y *Pratylenchus* los de mayor importancia mundial (Spaull y Cadet, 1990; Bond *et al.*, 2000).

Los nematodos que atacan el arroz presentan diversos hábitos parasíticos, los parásitos foliares que se alimentan del tallo, hojas y panículas y los parásitos de raíces. Las especies foliares más dañinas al arroz son *Ditylenchus angustus* y *Aphelenchoides besseyi*. Muchas especies de nematodos parásitos de raíces se han asociado a este cultivo y especies de *Meloidogyne* se han encontrado en muchos países; probablemente *M. graminicola* sea la más distribuida y dañina a nivel mundial. *Heterodera* spp. *Hirschmanniella* spp. y *Pratylenchus* spp. también se encuentran comúnmente afectando a este cultivo (Bridge *et al.*, 2005).

2.2.1. *Meloidogyne* spp.

El género *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nematoda: Heteroderidae) comprende a un grupo de nematodos parásitos de plantas de amplia distribución en el mundo, son polífagos y endoparásitos de raíces, se conocen como los “nematodos formadores de nódulos o agallas radiculares”. Se han descrito más de 100 especies validas, pero se considera que cuatro son las especies importantes y destructivas que causan el 90 % del daño estimado en el mundo (Sasser, 1980; Eisenback *et al.*, 1981; Siddiqi, 2000; Hunt y Handoo, 2009).

2.2.2. Ciclo de Vida

Los huevos de *Meloidogyne* spp., se encuentran inmersos en una masa gelatinosa, la cual los mantiene juntos y los protege tanto de las condiciones ambientales extremas como de depredadores. Las masas gelatinosas están compuestas por glicoproteínas y también se les atribuye propiedades antimicrobianas. Generalmente, están depositadas en la superficie de los nódulos, pero algunas veces se encuentran directamente sobre la superficie o dentro del tejido de la raíz de la planta hospedante. La masa de huevos es inicialmente suave, pegajosa y hialina, pero se hace más firme y de color marrón oscuro con el

tiempo (Moens *et al.*, 2009). Se pueden encontrar más de 1000 huevos en una masa, que puede ser más grande que el cuerpo de la hembra (Taylor y Sasser, 1983).

El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2, 4, 8, 16 a más células, hasta que se ve el primer estado juvenil completamente formado, enrollado y con un estilete. Se puede mover dentro del huevo pero no es muy activo. La primera muda tiene lugar en el huevo y no es difícil distinguir la cutícula del primer estado juvenil, sobresaliendo más allá de la cabeza del segundo estado juvenil (J2). Poco después, este emerge rompiendo la membrana flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete. La eclosión de los huevos es influenciada por la temperatura y ocurre sin requerir ningún estímulo por parte de la raíz de la planta, sin embargo, los exudados radiculares algunas veces estimulan la eclosión (Taylor y Sasser, 1983; Karssen y Moens, 2006).

El juvenil de segundo estado que ha emergido, se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la que pueda alimentarse. Su capacidad de sobrevivir se ve reforzada por varias adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la quiescencia y la diapausa, y las reservas de lípidos que prolongan su viabilidad hasta que llega e invade la planta hospedante (Moens *et al.*, 2009). La búsqueda de la raíz es al azar hasta que se acerca a unos cuantos centímetros. Luego, son atraídos por los exudados radiculares, acumulándose y penetrando la raíz por la zona de elongación debajo del punto de crecimiento. Se considera que el dióxido de carbono es el factor más importante para atraer a los juveniles de segundo estado (Taylor y Sasser, 1983; Hussey y Janssen, 2002; Karssen y Moens, 2006).

El juvenil de segundo estado penetra la raíz a través de algún punto de la zona subapical donde la endodermis presenta escaso desarrollo y no constituye una barrera física para el ingreso hacia el interior (Wyss *et al.*, 1992). El nematodo avanza hasta el tejido cortical y una vez allí la migración continúa intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular en diferenciación. El avance a través del espacio intercelular se realiza recurriendo a la separación de la laminilla media por medios mecánicos a través de golpes de estilete, sin haberse precisado hasta la fecha si también concurren mecanismos enzimáticos en el proceso. Cada

juvenil establece su sitio permanente de alimentación una vez que alcanza el cilindro vascular (Hussey y Williamson, 1998). Este sitio consiste en un conjunto de grandes células modificadas llamadas células gigantes, caracterizadas por la presencia de muchos núcleos de gran tamaño, altamente lobulados, con nucléolos prominentes, un alto número de orgánulos, citoplasma denso con altas tasas metabólicas y paredes engrosadas e invaginadas. Los nematodos absorben los nutrientes del citoplasma directamente o a través de tubos de alimentación sintetizados con tal propósito mediante las secreciones procedentes de las glándulas subesofágicas dorsales (Hussey y Mims, 1991).

Varios estudios han documentado los efectos de la infección por nematodos en la expresión génica. Algunos estudios en las células gigantes han revelado que el ARNm de algunos genes puede estar presente en niveles muchas veces mayor que en células de una raíz no infectada (Ramsey *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005). También se ha reportado que se incrementa los niveles de enzimas oxidoreductasas, indicando un aumento en la actividad metabólica (Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006).

Los nematodos del nódulo de la raíz secretan a través de su cutícula, enzimas antioxidantes que son producidas en la hipodermis y protegen al nematodo de la respuesta oxidativa del hospedante frente a la infección. Así también, las proteínas producidas y secretadas por las células de las glándulas esofágicas dentro de la planta hospedante por medio del estilete, son señales moleculares que desencadenan la activación de rutas de señalización, que conducen a la supresión de la defensa del hospedante y a la inducción de células gigantes (Abad *et al.*, 2009).

Mientras se están formando las células gigantes y los nódulos, aumenta el ancho del nematodo y hay una dilatación considerable de las glándulas esofágicas. Las células del primordio genital se dividen y éste se agranda haciéndose notorio, dos ramificaciones en la hembra o formando un cuerpo alargado en el macho (Taylor y Sasser, 1983).

Cuando se completan la segunda y tercera muda en la hembra, evidenciadas por las dos cutículas desprendidas, el estilete y el bulbo esofágico medio desaparecen. Poco después de la cuarta muda el estilete y el bulbo medio son regenerados, se forman el útero y la vagina y el patrón perineal se hace visible. La hembra de la cuarta etapa continúa aumentando de grosor y un poco más de longitud, sufriendo la última muda y desarrollándose como hembra adulta, de forma piriforme. Las hembras pueden producir huevos por dos a tres meses y viven algún tiempo más después de que cesa la producción de huevos. El ciclo termina cuando la hembra pone su primer huevo (Taylor y Sasser, 1983).

Después de la segunda y tercera muda en el macho, el estilete no es visible, el bulbo esofágico medio se ha degenerado y sólo la gónada se ha alargado. Luego ocurre una rápida metamorfosis: el cuerpo alargado se desarrolla dentro de la cutícula, completo con estilete, esófago con bulbo medio, espículas, y esperma en los testículos. El macho de la cuarta etapa es vermiforme y sufre una última muda y emerge de la raíz ya como adulto. No hay evidencia de alimentación por parte de machos adultos y pueden ser encontrados en especies partenogenéticas cuando las condiciones son desfavorables para el desarrollo de la hembra, por ejemplo, cuando las densidades son muy altas y hay una limitación del suministro de alimentos. Los machos probablemente viven sólo semanas (Taylor y Sasser, 1983; Moens *et al.*, 2009).

2.2.3. Formas de Reproducción

Existen tres tipos de reproducción dentro del género *Meloidogyne*: (a) anfigimixis, en el cual el esperma de los machos fertiliza los ovocitos en las hembras y posteriormente se produce una meiosis, (b) partenogénesis meiótica facultativa, en el cual en presencia de machos se produce una anfigimixis, pero en su ausencia, se lleva a cabo una meiosis en los ovocitos, con dos de sus núcleos, con una reducción de complemento cromosómico (el pronúcleo y el segundo cuerpo polar), posteriormente se fusionan (autogimixis), y (c) partenogénesis mitótica obligada, donde los machos no están involucrados y uno de los dos núcleos producidos durante la división mitótica inicial dentro del ovocito se deteriora y el otro se convierte en el precursor del embrión posterior (apomixis) (Chitwood y Perry, 2009).

Las poblaciones de una misma especie de *Meloidogyne* pueden ser diferentes en el modo de reproducción, por ejemplo, 29 de las 32 poblaciones estudiadas de *M. hapla* se reprodujeron por partenogénesis meiótica facultativa, las otras por partenogénesis mitótica (Chitwood y Perry, 2009).

Tanto en el género *Meloidogyne*, como en *Globodera* y *Heterodera*, los cromosomas sexuales están ausentes y la proporción de machos y hembras puede estar influida por factores ambientales. En las especies que se reproducen por partenogénesis meiótica y mitóticas, el hacinamiento, la escasez de alimentos, las temperaturas extremas u otras tensiones ambientales adversas, pueden dar lugar a la formación de machos por inversión sexual. Estos machos raramente inseminan hembras, e incluso cuando lo hacen, una división mitótica en el ovocito inicia la embriogénesis sin fusión con el núcleo de espermatozoide (Chitwood y Perry, 2009).

2.2.4. Factores del ambiente que afectan el desarrollo del nematodo

La temperatura, la humedad, la porosidad del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia de toxinas pueden limitar o detener el movimiento, el desarrollo y la eclosión de huevos de los nematodos noduladores de la raíz (Curtis *et al.*, 2009; Evans y Perry, 2009).

La temperatura no sólo afecta la tasa de multiplicación del nematodo sino también su distribución, especialmente en relación con la capacidad de sobrevivir a los efectos de alta o baja temperatura. Dentro del género *Meloidogyne* hay dos grupos, termófilos y criófilos, según su capacidad de sobrevivir las transiciones de fase de lípidos que se producen a 10 °C. *M. chitwoodi*, *M. hapla* y *M. naasi* son criófilos y pueden sobrevivir en el suelo a temperaturas de hasta por debajo de 10 °C, mientras que *M. javanica*, *M. arenaria* y probablemente *M. exigua* son termófilos y no sobreviven en el suelo a temperaturas inferiores a 10 °C (Evans y Perry, 2009).

Wallace (1964), reconoció el papel esencial desempeñado por la humedad del suelo en la supervivencia y eclosión de los huevos de *Meloidogyne*. La sequía excesiva puede frenar o incluso matar al nematodo, igual ocurre con el encharcamiento prolongado que, por falta de oxígeno en el suelo, el nematodo es

también afectado. Todos los juveniles de segundo estado requieren una película de agua de cierto grosor para su circulación en el suelo (Curtis *et al.*, 2009).

La textura del suelo es otro factor de importancia, la distribución y la severidad del ataque del nematodo dependen de ella. El daño y pérdidas de producción por nematodos noduladores de la raíz son generalmente más severos sobre suelos de textura arenosa (Wallace, 1964), debido que, en suelos pesados, la eclosión disminuye y el desplazamiento del nematodo se hace más lento.

2.2.5. Distribución y hospedantes

Las especies de *Meloidogyne* son parásitos obligados con una amplia distribución geográfica y rango de hospedantes. Tienen la capacidad de infectar raíces de numerosas plantas, con un rango de hospedantes que comprende más de 3.000 especies vegetales (Abad *et al.*, 2003), por lo tanto, se pueden considerar en general como polífagos. *M. incógnita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* son las especies generalizadas que representan el 95 % de los nematodos formadores de agallas radicales. Las primeras tres especies son de regiones tropicales y templadas, mientras que *M. hapla* se encuentra en climas fríos (Lamberti, 1979).

2.2.6. Sintomatología

El daño que ocasionan a las plantas se debe principalmente a la alteración de los tejidos vasculares de la raíz, que reduce sustancialmente la absorción de nutrientes y agua, con el consiguiente debilitamiento de la planta y disminución del rendimiento (Orton Williams, 1973; Siddiqi, 2000; Abad, *et al.*, 2003). Además, los efectos negativos de *Meloidogyne* se agravan en algunas ocasiones por interacciones con otros patógenos. Los síntomas más comunes e indirectos son la reducción del crecimiento, clorosis del follaje, susceptibilidad al marchitamiento y menor producción de frutos. La mayoría de especies de *Meloidogyne* inducen a la raíz infectada a engrosarse alrededor del punto donde el nematodo se está alimentando, formándose así el típico nódulo radicular. Los nódulos pueden presentarse simples, o varios de ellos coalescen para formar un conjunto masivo de nódulos. Algunas especies estimulan también a la planta a producir muchas raíces laterales que emergen de la agalla, lo que da por resultado un sistema radical compacto, anormalmente abundante y entrelazado. Aunque algunas especies

producen un tipo característico de nodulación, la identificación de ellas no puede hacerse basándose solamente en estos síntomas radicales (Eisenback *et al.*, 1981).

2.2.7. Identificación de especies de *Meloidogyne*

Las identificaciones a nivel de especies de los nematodos formadores de agallas radicales presentan muchas dificultades. La morfología, la morfometría variable, los efectos del hospedante, la variación intraespecífica, la reproducción partenogenética, la existencia de especies crípticas y el número cada vez mayor de especies descritas, generan confusión y limitan la identificación de especies de *Meloidogyne* que dependen predominantemente de una estrategia reproductiva partenogenética (Hunt y Handoo, 2005).

La verificación de poblaciones mixtas y/o la detección de especies poco comunes requiere técnicas de identificación distintas a la prueba de hospedantes diferenciales, que incluyen las morfológicas (patrón perineal de hembras adultas, machos, forma de la región labial del J2 y hembra, morfología del estilete, longitud y forma de la cola del J2) y, en algunos casos, métodos bioquímicos o moleculares. Con el aumento del número de especies descritas los valores de muchos de estos caracteres han demostrado una gran variación intraespecífica. La técnica de la electroforesis de isoenzimas ha permitido identificar otras especies no comunes, aunque son los métodos moleculares basados en la PCR los que actualmente vienen contribuyendo a una correcta y mejor identificación de nuevas especies (Hunt y Handoo, 2005).

2.2.7.1. Uso de patrones perineales

El patrón perineal comprende el área del extremo de la cola, fasmidios, líneas laterales, ano y vulva; todo rodeado por pliegues o estrías cuticulares. Los caracteres morfológicos del patrón perineal usados en la identificación son: forma del diseño perineal (rectangular, circular, oval, piriforme, de reloj de arena, etc.), arco dorsal (alto, bajo redondeado, aplanado), líneas laterales (presentes o ausentes), forma de las estrías (finas, gruesas, cortas, quebradas, lisas, onduladas, en zigzag), hombreras (presentes o ausentes), puntuaciones al término de la cola (presentes o ausentes), alas en uno o a ambos lados del diseño (presentes o

ausentes). Aunque los patrones perineales de individuos y poblaciones dentro de una especie varíen, las características básicas de cada especie no lo hacen (Taylor y Sasser, 1978; Hirschamann, 1985).

2.2.7.2. Análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas

La caracterización enzimática, es un método descrito para identificar a las hembras de diversas especies de *Meloidogyne* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Varios perfiles isoenzimáticos se han utilizado para distinguir las especies de *Meloidogyne*, la carboxilesterasa / esterasa EST (EC 3.1.1.1) resulta la más útil, otras como malato deshidrogenasa MDH (1.1.1.37), superóxido dismutasa SOD (1.15.1.1) y glutamato oxaloacetato, transaminasa GOT (EC 2.6.1.1) también se utilizan para confirmar la identificación de especies realizadas con EST y MDH. En la electroforesis, la EST o MDH se presentan como bandas de color, las cuales son especie-específicas. Dicho método es muy sensible, ya que se necesita sólo una hembra para hacer la identificación, por lo tanto, es útil para la detección temprana de mezclas de especies. La estabilidad relativa de los fenotipos isoenzimáticos en *Meloidogyne* spp. representa una herramienta útil para la identificación del nematodo, entre los sistemas de isoenzimas, la EST tiene el valor diagnóstico más alto ya que es el fenotipo que más se ha descrito (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985).

Los fenotipos de enzimas se designan indicando las especies de *Meloidogyne* que cada una específica y el número de bandas detectadas. Los fenotipos con el mismo número de bandas se diferencian por letras pequeñas (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985, 1990). La comparación de perfiles electroforéticos de esterases han demostrado gran consistencia para distinguir especies de *Meloidogyne*, sin embargo, los perfiles de malato deshidrogenasa ayudan en la identificación cuando los perfiles de esterases son similares, como, por ejemplo, con *M. incognita* y *M. hapla* (Williamson, 1991). Algunas 16 especies, como *M. arenaria*, muestran varios perfiles diferentes, aunque esto puede indicar de la existencia de especies crípticas (Hunt y Handoo, 2009).

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Período de ejecución y ubicación geográfica de las zonas muestreadas para la obtención de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

El trabajo de investigación se realizó entre los meses de junio de 2016 y febrero de 2017, las muestras se colectaron en algunas zonas productoras de caña de azúcar, banano y arroz ubicadas en las regiones de Piura y San Martín (Cuadro 1).

3.1.2. Fase de laboratorio

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Nematología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura y en el Megalaboratorio de Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno.

Cuadro 1. Ubicación geográfica de las zonas productoras muestreadas de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz.

Región	Zonas productoras	Ubicación geográfica
Piura	Valle del Chira, Valle del Medio Piura	04°53'18" de latitud sur y 80°41'07" longitud oeste.
San Martín	Valle del Alto Mayo, Rioja	5°48'18.4" de latitud sur y 77°19'11.5" longitud oeste

En campo, las muestras de raíces de cada cultivo se evaluaron para confirmar la presencia de las agallas típicas producidas por *Meloidogyne* spp., las cuales se codificaron de acuerdo al cultivo y lugar de procedencia.

3.2. Muestreos

La obtención de muestras se realizó en suelos con humedad (30 a 40 % de su capacidad de campo), el número de submuestras para obtener una muestra compuesta (suelo más raíces) estuvo supeditada a la superficie de cada sitio o lugar de muestreo. Las submuestras se tomaron siguiendo un esquema de muestreo sistemático en forma de V o zigzag entre las filas dentro del cultivo y a una distancia equidistante entre cada submuestra. Las submuestras se colectaron con la ayuda de una palana a una profundidad entre 20 a 30 cm colocándose en una bolsa o balde plástico. Posteriormente se mezclaron para tomar la muestra compuesta final de 1 kg más raíces (20 a 40 g). Las muestras se acondicionaron en bolsas plásticas y se etiquetaron para su traslado al laboratorio de Nematología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura.

3.3. Procesamiento y extracción de nematodos de muestras de suelo

Las muestras compuestas se conservaron a 10°C y se procesaron en los primeros 10 días de la fecha de toma de muestras en el campo. Para la extracción del J2 de *Meloidogyne* spp. del suelo se utilizó el método de flotación-centrifugación (Jenkins, 1964). La muestra de suelo se homogenizó para obtener 100 cm³, la cual se puso en un balde vacío, luego se agregó 1 litro de agua, se mezcló con la finalidad de desagregar los terrones y liberar de los nematodos en la suspensión. La suspensión se pasó a través de un tamiz de 20 Mesh, recogién dose en un balde. Posteriormente, la suspensión se vertió a través de un tamiz de 500 Mesh. Lo retenido sobre el tamiz de 500 Mesh se llevó a un vaso con capacidad de 100 ml, colectándose aproximadamente 40 ml. A los 40 ml se agregó una cuchara de caolín, se homogenizó y se centrifugó por 4 min a 1,750 rpm. En cada tubo se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionó la solución de sacarosa (500 g de azúcar disuelta en 1 L de agua). Se centrifugó por segunda vez a 1,750 rpm por 2 min, vertiéndose cuidadosamente el sobrenadante en un tamiz de 500 Mesh, se lavó con agua para retirar la solución de sacarosa y luego colectar los nematodos en placas de vidrio para su análisis bajo el microscopio y cuantificar los nematodos presentes.

3.4. Procesamiento y extracción de huevos más J2 de *Meloidogyne* spp. de raíces

Se aplicó la técnica de la trituración-centrifugación (Coolen, 1979). Las raíces infestadas se cortaron en pedazos de aproximadamente 1 cm, muestras de 1 g más una solución de hipoclorito de sodio (0.5 % NaOCl) se tritularon en una licuadora por 1 min en máxima velocidad. Los restos vegetales se pasaron por un tamiz de 20 Mesh, y 500 Mesh, superpuestos uno sobre otro, Se colectó con una pizeta conteniendo agua la suspensión de nematodos contenidos en el tamiz de 500 Mesh, los cuales se depositaron en vaso de 100 ml. La suspensión se vertió en los tubos de centrifugación y se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en el punto 3.3

3.5. Aislamiento de poblaciones

3.5.1. Obtención de poblaciones en plantas de tomate

Como hospedante susceptible se utilizó el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Rio grande). Se sembraron semillas en bandejas de germinación conteniendo turba esterilizada, las plantas se mantuvieron por un periodo de 15 días o hasta cuando tuvieron 4 hojas verdaderas. Luego se trasplantaron en macetas plásticas de 1000 cm³ conteniendo una mezcla de suelo naturalmente infestado por el nematodo más restos de raíces agalladas. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero por 45 días, se abonaron cada siete días con un fertilizante balanceado (20-10-20) soluble en agua. Huevos y juveniles en segundo estado (J2) del nematodo se extrajeron de las plantas de tomate con raíces agalladas con una solución de 0.5% de NaOCl (Hussey y Barker, 1973). Este inóculo se utilizó para los ensayos de purificación de las respectivas poblaciones del nematodo.

3.5.2. Purificación de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

Para la purificación de cada población del nematodo se utilizó como fuente de inóculo huevos + J2 extraídos de raíces de tomate, inoculándose en plantas de tomate de 14 de días edad trasplantadas en macetas plásticas de 1000 cm³ conteniendo una mezcla arena + tierra de almácigo (50/50) esterilizada. Las plantas inoculadas se mantuvieron por 45 días en invernadero, pasado este período

se obtendrán las hembras del nematodo para realizar la observación de diseños perineales y caracterización bioquímica de poblaciones.

3.6. Observación de diseños perineales hembras de *Meloidogyne* spp.

Para la caracterización morfológica a través de la configuración de la región perineal de hembras adultas se seleccionaron agallas, con una aguja de punta fina se aislaron las hembras en una cantidad mínima de diez (Fig. 1 A), se colocaron en una placa Petri conteniendo una gota de ácido láctico por un periodo de 24 h. Después, se cortó el cuello de las hembras y se apretó lentamente para que salga el contenido interno de cada hembra (Fig. 1 B y C). Con mucho cuidado se realizó un corte de forma cuadrada de la región perineal (Fig. 1 D y E), cada corte perineal fue transferido a una lámina y luego se selló con esmalte incoloro y observadas al microscopio para su caracterización morfológica (Hartman y Sasser, 1985).

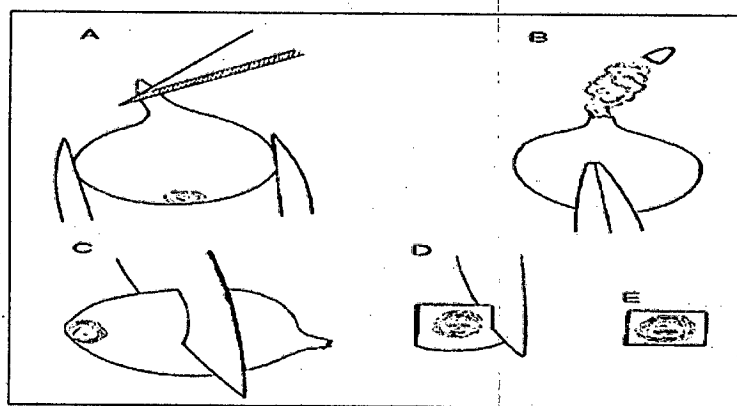


Figura 1. Procedimiento para la obtención de poblaciones de *Meloidogyne* A: Corte del cuello de la hembra con bisturí. B: Remoción del contenido interno de la hembra con una pinza. C: Corte de la parte anterior de la hembra D y E: Cortes en forma cuadrada de los perineales de la hembra para su posterior observación en microscopio (Taylor y Netscher, 1974).

3.7. Caracterización bioquímica para especies de *Meloidogyne*

Para la caracterización bioquímica se tomaron hembras adultas de coloración blanca lechosa de las raíces agalladas de cada población de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz. Las hembras se extrajeron con una aguja de punta fina mediante el uso de un microscopio estereoscopio. Cada hembra retirada del interior de las raíces se colocó en un tubo capilar conteniendo 2 – 3 μ L de solución tampón de extracción de enzima esterasa (tampón sacarosa) y mantenidas en hielo

(Dalmasso & Bergé, 1978). Las masas de huevos de las respectivas hembras extraídas también se colectaron y almacenaron individualmente en micro tubos (eppendorf) conteniendo solución salina al 1% para la probable purificación de especies de *Meloidogyne* detectadas en mezcla (Carneiro *et al.*, 1996).

Después de extraídas las hembras se preparó un gel de poliacrilamida al 7% (11 x 18 cm, 1 mm de espesor), las hembras se maceraron individualmente y colocadas con ayuda de una jeringa en el papel filtro cualitativo (3 mm Whatman). Se depositó una gota de azul de bromofenol (0,01 %) en la primera, media y última muestra del respectivo gel. Después de la aplicación de la muestra, el gel se colocó en una cuba a una fuente de 80 voltios, manteniéndose en refrigeración a 5°C (Carneiro y Almeida, 2001). Después de la migración de 5 cm del azul de bromofenol en el gel (2 horas), la potencia se apaga y el gel, se sometió a la enzima esterasa, utilizando una solución de 50 ml de tampón fosfato (50 mg de Fast Blue RR sal y 1,5 ml de α -naftil acetato 1%). Luego, el material se llevó a la incubación, donde permaneció en una estufa a 37°C durante unos 20 a 30 minutos hasta que las bandas esterásticas (oscuras) aparecieron sobre fondo claro. Posteriormente los geles se transfirieron a una solución que contenía 10% de ácido acético y una solución de alcohol metílico 40 % por 30 min. Después de la fijación, los geles se colocaron entre dos hojas de papel de celofán y se secaron a temperatura ambiente.

La identificación de fenotipos se realizó mediante el cálculo de la movilidad relativa (R_m) de cada banda polimórfica de la primera banda del patron *M. javanica* Est. J3 (1.00, 1.23, 1.40) (Carneiro y Almeida, 2001). Los fenotipos enzimáticos encontrados se identificaron por una letra y un número que corresponden a la inicial del nombre específico del cultivo junto con el número de bandas, respectivamente (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985; 1990). La aparición de diferentes fenotipos se expresa en porcentaje.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

Se colectaron 6 muestras de raíces y suelo de plantas de banano, caña de azúcar y arroz en diferentes zonas productoras de las regiones de Piura y San Martín, la primera ubicada geográficamente en la costa norte y la segunda en la selva norte del Perú (Fig. 2 y 3). En todas las muestras colectadas se observaron raíces parasitadas (Fig. 4) por el “nematodo formador de agallas radiculares” *Meloidogyne* spp., estimándose diferentes niveles de infestación en suelo e inóculo (huevos + J2) en raíces de (Cuadro 2). Las plantas de caña de azúcar y arroz afectadas por el nematodo presentaban síntomas de menor crecimiento y clorosis en casi toda el área foliar (Fig. 4b y 4c). En el banano se observan síntomas de amarillamiento en hojas, aunque el daño más notorio es el menor número de racimos y peso de frutos (Fig. 4a).

Cuadro 2. Niveles de infestación en suelo e inóculo en 6 poblaciones de *Meloidogyne* spp. procedentes de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz en diferentes zonas de las regiones de Piura y San Martín.

Muestra	Procedencia	Cultivo	Nº de	Huevos +
			individuos/ 100 cm ³ de suelo	J2/g de raíces
1	Cieneguillo – Piura	Banano	150	960
2	Valle del Chira – Piura	Banano	62	6405
3	Rioja – San Martín	Banano	15	420
4	Paita – Piura	Caña de azúcar	27	716
5	Cieneguillo – Piura	Caña de azúcar	72	300
6	Medio Piura	Arroz	20	198

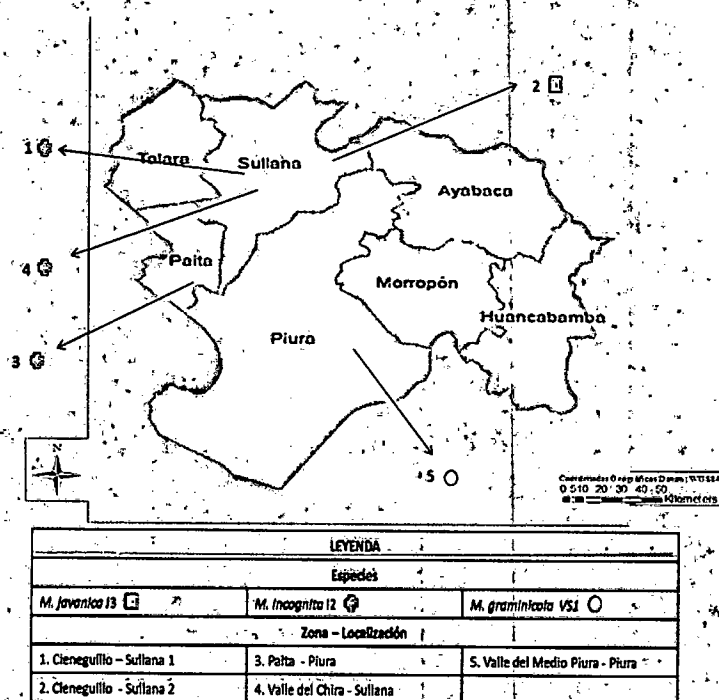


Figura 2. Localización y distribución de especies de *Meloidogyne* en los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz en diferentes sectores productores de la región Piura.

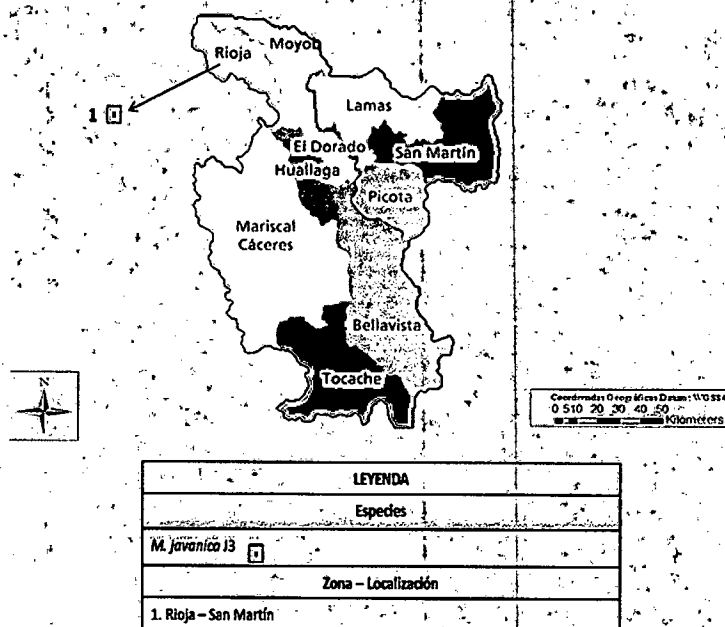


Figura 3. Localización y distribución de especies de *M. javanica* en el cultivo de banano en el distrito de Rioja, región San Martín.

Las seis poblaciones de *Meloidogyne* spp. se caracterizaron bioquímicamente, detectándose tres fenotipos esterásicos entre las poblaciones procedentes de las diferentes zonas muestreadas (Cuadro 3, Fig. 2 y 3).



Figura 4. Plantas de banano (a), caña de azúcar (b) y arroz (c); presentando síntomas de amarillamiento en hojas, menor crecimiento y agallas en raíces causadas por *Meloidogyne* spp.

4.2. Caracterización bioquímica

Trés fenotipos de esterasa se identificaron en los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz (Fig. 5 y 6). El fenotipo I2 (Rm: 1.0, 1.1) típico de *M. incognita* se detectó en el 50.0 % de muestras, el fenotipo J3 (Rm: 1.00, 1.23, 1.39) correspondiente a *M. javanica* se detectó en el 33.3 % de muestras y el fenotipo VS1 (Rm: 0.70) de *M. graminicola* en el 16.7 % de muestras.

Cuadro 3. Fenotipos isoenzimáticos de esterasa observados en 6 poblaciones de *Meloidogyne* spp. provenientes de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz colectados en diferentes zonas de la costa y selva norte del Perú.

Muestra	Procedencia	Cultivo	Especie	Fenotipo esterasa
1	Cieneguillo – Piura	Banano	<i>M. incognita</i>	I2
2	Valle del Chira – Piura	Banano	<i>M. javanica</i>	J3
3	Rioja – San Martín	Banano	<i>M. javanica</i>	J3
4	Paita – Piura	Caña de azúcar	<i>M. incognita</i>	I2
5	Cieneguillo – Piura	Caña de azúcar	<i>M. incognita</i>	I2
6	Valle del Medio – Piura	Arroz	<i>M. graminicola</i>	VS1

M. incognita se detectó asociada al cultivo de banano en la zona del valle de Cieneguillo, Piura (05° 1'54" S, 80° 39' 8.7" O) y en el cultivo de caña de azúcar tanto en el distrito de Paita, Piura (05° 5'28" S, 81°6'23" O) y en el valle de Cieneguillo, Piura (05° 1'54" S, 80° 39' 8.7" O). Se confirma que en la región Piura esta especie es polífaga y de amplia distribución geográfica.

M. javanica se identificó en el cultivo de banano tanto en el valle del Chira, Piura (04°53'18" S, 80°41'07" O) y en el distrito de Rioja ubicado en la región San Martín (5°48'18.4" S y 77°19'11.5" O). Por la ubicación geográfica de los lugares de procedencia de las poblaciones se determina que *M. javanica* también se encuentra distribuida tanto en la costa y selva del norte del Perú.

M. graminicola se identificó asociada al cultivo de arroz en el valle del Medio Piura (04° 04'50" S, 79° 13' 15" O). Se conoce que probablemente, *M. graminicola* es la especie que más daño ocasiona al sistema radicular de este cultivo, se ha encontrado distribuida en el sur y sureste de Asia, Estados Unidos, Brasil y Colombia tanto en ecosistemas de alta y baja altitud (Bridge *et al.*, 2005), lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Diferentes especies de *Meloidogyne* pueden invadir raíces de banana y ser una importante limitación de la producción en condiciones subtropicales secas (Gowen y Quénérhervé, 1990). Aparte del típico síntoma en las raíces (formación de agallas), la infección de estos nematodos causa una significativa supresión del crecimiento, reducen la producción y vida productiva de la planta (Speijer y DeWaele, 1997). En las tres zonas bananeras evaluadas se encontraron asociadas las especies *M. incognita* y *M. javanica*, ambas causan agallamientos severos en las raíces (Fig. 4a). *M. javanica* se identificó tanto en la costa como en la selva. Los resultados de este estudio coinciden con Daneel *et al.* (2015), estos autores realizaron un muestreo nematológico en diferentes variedades de las tres principales áreas productoras de banana en Sudáfrica y concluyeron que *M. incognita* y *M. javanica* son los nematodos de mayor abundancia en este país. En Piura, se identificaron ambas especies y en dos zonas geográficas con condiciones climáticas parecidas, suelos arenosos y con un sistema de riego permanente, características subóptimas para el cultivo de banano, pero, favorables a estos parásitos (Vovlas *et al.*, 1993), lo que se demuestra por los altos niveles de infestación estimados (Cuadro 2).

En varias zonas productoras de caña de azúcar en el mundo *M. incognita* es el principal fitonematodo que afecta a este cultivo (Sasser, 1979; Salawu, 1990; Moura, *et al.*, 2000), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en las dos zonas productoras de caña de azúcar se identificó *M. incognita*. Los niveles poblacionales estimados y los síntomas observados en las plantas afectadas indican altos niveles de infestación y daños causados por este nematodo (Cuadro 2 y Fig. 4b), las dos empresas cañeras más importantes que producen etanol en la región Piura desarrollan este cultivo en suelos arenosos, y en ese sentido, se conoce que las especies de *Meloidogyne* abundan con mayor frecuencia en los suelos arenosos más que en los de textura fina, factores del medioambiente que favorecen su parasitismo y patogenicidad (Blair *et al.*, 1999),

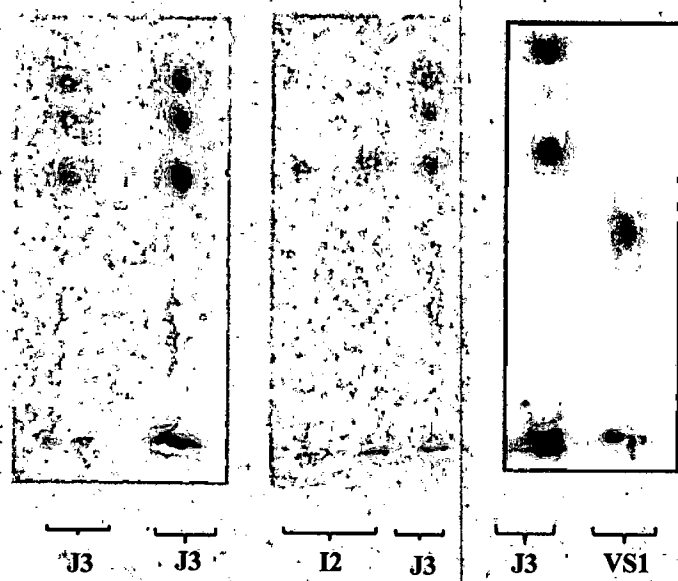


Figura 5. Fenotipos de ésterasa detectados en 6 poblaciones de *Meloidogyne* spp. provenientes de los cultivos de banano, caña de azúcar y arroz de diferentes regiones geográficas de la costa y selva norte del Perú. *M. javanica* (J3), *M. incognita* (I2) y *M. graminicola* (VS1).

N° banda	Rm	<i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. graminicola</i>
1	0.70			
2	1.00			
3	1.10			
4	1.23			
5	1.39			
Est		J3	I2	VS1

Figura 6. Fenotipos de esterasa (Est) detectados en seis poblaciones de *Meloidogyne* spp. aisladas de los cultivos de caña de azúcar, banano y arroz procedentes de diferentes regiones productoras de las regiones de Piura y san Martín.

4.3. Caracterización morfológica

La configuración de la región perineal de las poblaciones caracterizadas como *M. incognita* Est. I2 presentan arco dorsal alto y trapezoidal, estriás onduladas y bifurcación en la región de los campos laterales, características típicas de la especie (Fig. 7A). La configuración perineal de las poblaciones Est. VS1 presentan un patrón perineal redondo/oval, arco dorsal bajo y líneas lisas que coinciden con el patrón de *M. graminicola* (Fig. 7B) (Hunt y Handoo, 2005).

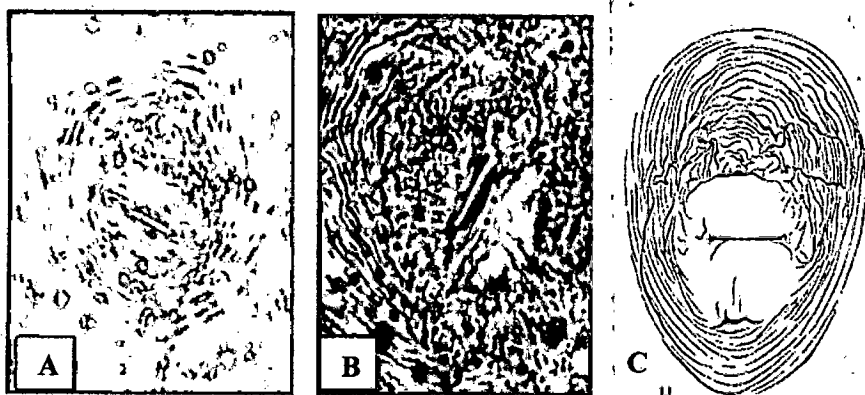


Figura 7. Patrón A :rineales de tres especies de *Meloid* C e. A: *M. incognita*; B: *M. graminicola* y C: *M. javanica* (Hunt y Handoo, 2009); detectadas en diferentes regiones geográficas y cultivos en la costa y selva norte del Perú.

La información obtenida en este trabajo permite conocer la composición de especies de *Meloidogyne* en tres cultivos alimentarios e industriales, lo que hasta la fecha no se conocía. La identificación de estas especies se ha realizado con un número de muestras muy limitada por razones logísticas, hace falta un mapeo más amplio con la finalidad de estimar la prevalencia y abundancia de especies de *Meloidogyne* en otras zonas productoras de estos cultivos en la costa y selva del norte del Perú.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

- a. Se identificaron dos especies de *Meloidogyne* asociadas al cultivo de banano en la costa y selva norte del Perú. *M. incognita* con fenotipo I2 es la especie asociada a una zona productora zona de la región Piura y *M. javanica* con fenotipo J3 se detectó tanto en la costa como en la selva.
- b. En el cultivo de caña de azúcar sólo se identificó a *M. incognita*.
- c. En el cultivo de arroz se identificó el fenotipo VS1 correspondiente a *M. graminícola*.
- d. Las especies de *Meloidogyne* identificadas en banano, caña de azúcar y arroz son los primeros reportes para estos cultivos en la costa y selva norte del Perú.

CAPÍTULO 6

6. RECOMENDACIONES

- a. Realizar muestreos nematológicos en otras regiones geográficas productoras de banano, caña de azúcar y arroz con la finalidad de identificar especies de *Meloidogyne* asociadas a estos cultivos.
- b. Realizar muestreos nematológicos otras regiones geográficas productoras de banano, caña de azúcar y arroz para estimar la ocurrencia, distribución y abundancia de *Meloidogyne* spp.
- c. Realizar pruebas de patogenicidad de las diferentes especies encontradas.

CAPÍTULO 7

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad, P., Favery, B., Rosso, M., and Castagnone-Sereno, P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4: 217–224.

Abad, P.; Castagnone-Sereno, P., Rosso, M.N., De Almeida, J., and Favery, B. 2009. Invasion, feeding and development. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. *Root-knot nematodes*. London, UK. CAB International. p. 163-176.

Agrobanco Perú, 2013. Disponible en: <http://Guía Técnica Manejo Integrado De Cultivo De Banano Orgánico>.

Blair, B.L., Stirling, G.R., and Whittle, P.J.L. 1999. Distribution of pest nematodes on sugarcane in South Queensland and relationship to soil texture, cultivar, crop age and region. *Australasian Journal of Experimental Agriculture* 39, 43–49.

Bridge, J., Plowright, R.A., and Peng, D. 2005. Nematode parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R. and Bridge, J. (eds) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd Edition. CABI Bioscience, Egham, UK. pp 87- 130.

Carneiro, R.M.D.G. & Almeida. M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*. V.25, n.1, p.35 – 44.

Carneiro, R.M.D.G; Almeida, M.R.A. & Carneiro, R.G. 1996. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology*, v.19, n. 6, p.555 – 560.

Champion, J. 1968. El platano. Editorial Blume. Barcelona, España. 247pp

Chitwood, D.J. and Perry, R.N. 2009. Reproduction, Physiology and Biochemistry. In Perry, R; Moens, M; Starr, J. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 182-194.

Coolen, W.A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: Lamberti, F. and Taylor, C.E. (eds) Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* Species) Systematics, Biology and Control. Academic Press, London, pp. 317-329.

Curtis, R., Robinson, A., y Perry, R. 2009. Hatch and host location. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL eds. *Root-knot nematodes*. London, Uk. CAB International 139-155 p.

Dalmasso, A & Bergé, J.B. 1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp. em áreas produtoras de banana no Brasil. *Nematologia Brasileira*, v.25, p.126.

Daneel, M., De Jager, K., Van den Bergh, I., De Smet, M., and De Waele, D. 2015. Occurrence and pathogenicity of plant-parasitic nematodes on commonly grown banana cultivars in South Africa. *Nematropica* 45:118-127.

De Datta, S.k. 1987. Producción de arroz. Fundamentos y prácticas. 690 p.

Eisenback, J. D., H. Hirschmann, J. N. Sasser, and A. C. Triantaphyllou. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. Department of Plant Pathology, North Carolina State University/USAID. North Carolina State Graphics, Raleigh.

Esbenshade, P.R., and Triantaphyllou, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 17: 6 – 20.

Esbenshade, P.R., and Triantaphyllou, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identifications of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22: 10 – 15.

Gowen S. and Quénéhervé P., 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. Pp. 431-460. In: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* (Luc M., Sikora R.A. and Bridge J., eds). CAB International, Wallingford, UK.

Hartman, K.M., and Sasser, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C. and Sasser, J.N. (eds) *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume II. Methodology*. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development, North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, pp. 69–77.

Hirschmann, H. 1985. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In Sasser, JN; Carter, CC. eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne. v. 1: Biology and Control*. North Carolina. USA. Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. p. 79-93.

Hunt, D.J., and Handoo, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In Perry, R.; Moens, M; Starr, J. eds. *Root-knot nematodes*. London, UK. CAB International. pp. 55-97.

Hussey, R.S., and Janssen, G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L., Cook, R. and Bridge, J. (eds) *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB Internrtional, Wallingford, UK, pp. 43–70.

Hussey, R.S. and Mims, C.W. 1991. Ultraestructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma* 156:9-18.

Hussey, R.S., and Barker, K.R. 1973. A comparison of methods on collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.

Hussey, R.S., and Williamson, V.M. 1998. Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. In Barker, KR; Pederson, GA; Windham, GL. eds. Plant and Nematode Interactions. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. p. 87-108.

Jenkins, W.R. (1964). A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48, 692.

Karszen, G., and Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. In: Perry, R.N. and Moens, M. (eds) *Plant Nematology*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 59–90.

Lamberti, F. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* spp. in subtropical and Mediterranean climates. 341-357. In: Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species) Systematics, Biology and Control. F. Lambert y C.E. Taylor, eds. Academic Press, New York.

MINAG-DGCA-DIA, 2012. Disponible en:

http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/agroeconomiaa_rroz3.pdf

MINAG-DGCA-DIA, 2015. Disponible en:

<http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf>

Moens, M., Perry, R.N., and Starr, J.L. 2009. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International, p. 1-13. Moens, M; Starr, JL. eds. *Root-knot nematodes*. London, Uk. CAB International 139-155 p.

- Moura, R. M., Pedrosa, E. M. R. Maranhã, S. R. V. L. Macedo, M. E. A. Moura, A. M. Silva, E. G. and Lima, R. F. 2000. Ocorrência dos nematóides *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. Fitopatologia Brasileira 25:101-103.
- Orton Williams, K.J: 1973. *Meloidogyne incognita*. C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 2, Nº 18, 4 pp.
- Ramsey, K., Wang, Z, and Jones, M.G.K. 2004. Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes. Molecular Plant Pathology 5,587-592.
- Sasser J.N. 1980. Root-Knot nematodes: a global menace to crop production. Plant Disease 64: 36-41.
- Sasser, J.N. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In: Lamberti, F. and Taylor, C.E. (eds) Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species) Systematics, Biology and Control: Academic Press, London, pp. 359-373.
- Siddiqi, M, R. 2000. Morphological characters and taxonomic methods. In: Tylenchide parasites of plant and insects. Second edition. CAB Internacional. UK.
- Sikora, R. A., and Fernández, E. 2005. Nematode Parasites of Vegetables. In: Michel Luc, M., Sikora, R.A., and Bridge, J. (eds) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. London, UK. CAB International, pp. 319-392.
- Simmononds, N.W. 1973. Los platanos. Editorial Blume: Barcelona, España. 539pp
- Spaull, V. W., and Cadet. P. 1990. Nematode parasites of sugarcane. Pp. 461-491 in M. Luc., R. A. Sikora, and J. Bridge, eds. Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Oxon, U.K.: CAB International.

Speijer P.R. and De Waele D., 1997. Screening of Musa germplasm for resistance and tolerance to nematodes. INIBAP Technical Guidelines, Montpellier, France, 48 pp.

Stover, R.H. Y N.W. Simmonds. 1987. Bananas. Longman Scientific & Technical. 468.

Taylor, A. y Sasser, J. 1983. Biología, identificación y control de los nemátodos del nódulo de la raíz. North Carolina. EE.UU. Proyecto Internacional de Meloidogyne. Publicación Cooperativa entre el Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte y la Agencia de EEUU para el desarrollo Internacional. 111 p.

Taylor, A.L., and Sasser, J.N. 1978. Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne Species*). North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina.

Vovlas, N., Di Vito, M., and Grammafikaki, G. 1993. Growth response of in vitro produced banana plantlets to *Meloidogyne javanica* in pots. Nematropica 23:203--208

Wallace, H. 1964. The biology of plant parasitic nematodes. London, UK. Edward Arnold. 280 p.

Williamson, V.M. 1991. Molecular Techniques for Nematode Species Identification. In Nickle, WR. ed. Manual of Agricultural Nematology. New York. USA. Marcel Dekker Inc. p. 107-123.

Wyss, U., Grundler, F.M.W., and Munich, A. 1992. The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. Nematológica 38: 98-111.